

令和元年6月10日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08939

研究課題名（和文）糖代謝異常の臓器特異的病態マーカーとなるエクソソーム内在長鎖非コードRNAの探索

研究課題名（英文）The investigation of long noncoding RNA in exosome as a marker for glucometabolism in organ

研究代表者

高橋 伸彦（Takahashi, Nobuhiko）

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：20372279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題は糖尿病などの糖代謝異常において、臓器毎の病態マーカーとなりえるエクソソーム（分泌小胞）内在長鎖非コードRNAを探索するものである。研究の結果、病態を反映するエクソソーム中の核酸マーカーの基礎的なデータが得られた。また、骨格筋細胞や脂肪細胞において、インスリン抵抗性によって変化する細胞内長鎖非コードRNAを同定した。さらに糖尿病治療薬メトホルミンで影響を受ける細胞内lncRNAの検討を通じて、骨格筋の糖取り込みに関与する長鎖非コードRNAを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病の病態は個人個人で異なっている。この研究によって糖尿病の病状の評価に役立つ臨床検査指標を創出するための基礎的なデータが得られた。今後はこのデータを検証することで、一人一人の糖尿病患者さんの病態評価や治療薬の選択および効果の評価といった個別化医療への応用に発展することが期待される。さらに、予期せず骨格筋における糖取り込みに関係する長鎖非コードRNAを発見した。この長鎖非コードRNAは核酸医療などによって新たな糖尿病治療の標的となる可能性を秘めており、今後の研究発展の礎となった。

研究成果の概要（英文）：In this research, we explored the roles of exosome-containing long noncoding RNAs in in each organ which is involved in the pathogenesis of glucose dysmetabolism such as diabetes for the application of clinical evaluation. As a result, we obtained the list of potential RNAs in the exosomes for the evaluation of insulin resistance in the skeletal muscle. In addition, we found that many lncRNAs are associated with insulin resistance in the skeletal muscle cells and adipocytes. Moreover, in search of metformin-affected lncRNAs, we discovered that lncRNA Dreh is implicated in the glucose transport in the skeletal muscle cells.

研究分野：代謝病学、糖尿病学、内科学、臨床検査医学

キーワード：糖尿病 非コードRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病有病者数はその可能性が否定できない者も含め 2,050 万人と推定されている (H24 年国民健康・栄養調査、厚生労働省)。このような数の多さに加え、耐糖能異常や 2 型糖尿病に代表される糖代謝異常の病態は各個人で異っており、その対応を複雑にしている。また昨今、糖尿病治療薬の種類は増加し、病態に応じた治療が求められている。このような諸問題を解決する一助として、各個人における臓器毎の詳細な病態評価が必要である。しかし、糖代謝異常の病態、特にインスリン抵抗性・感受性については BMI や HOMA-IR などの大まかな指標を頼りに診療がなされているのが現状で、インスリン作用に直接関与する骨格筋、脂肪細胞あるいは肝細胞など個々の臓器 (細胞) の異常を反映する簡便な臨床検査指標は得られていない。

エクソソームは細胞より分泌される直径 30~200 nm 程度の小胞で、種々の蛋白や非コード RNA などを内包している。これらの物質はその由来する細胞の種類によって異なり、また病態に応じて変化することが知られていることから、エクソソーム内の物質は細胞あるいは臓器に加わる様々な情報を統合したより高次のシグナル群と考えられる。実際、エクソソーム内にはさまざまな物質が内包されており、その多くは蛋白質をコードしない非コード RNA (noncoding RNA; ncRNA) である。ncRNA の中でも主体となるのは microRNA (miRNA) であるが、他に ribosomal RNA や長鎖非コード RNA (long noncoding RNA; lncRNA) が少量含まれている。エクソソーム中の miRNA は癌などの病態マーカーとして数々の報告がなされている。一方、lncRNA は miRNA に比し種類も多く、その細胞内における作用から重要な生体機能調節因子の一つであるといえるが、これまでにエクソソーム内の lncRNA と糖代謝異常の関係についての知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究は糖代謝異常を反映するエクソソーム中の長鎖非コード RNA を臓器毎に同定し、糖尿病患者の病態・治療の評価に有用な血液あるいは尿を検体とした臓器特異的病態マーカーの創出を目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではエクソソーム中の lncRNA の解析を行う (下記 1) ことに加えて、細胞内の lncRNA の解析 (2, 3) も行うことにより病態を正確に反映する分子の探索を行った。

(1) インスリン抵抗性によるエクソソーム内 lncRNA の変化

骨格筋細胞モデルとして C2C12 筋芽細胞を既報に準じて骨格筋細胞 (筋管細胞) に分化させて実験に用いた。インスリン抵抗性の惹起には細胞透過性セラミドを用いた。セラミドを作用させた細胞の培養培地を Viva Spin にて濃縮し検体とした。エクソソームの抽出は 3 種類の方法 (ポリマー沈殿法、リン脂質アフィニティー法、サイズ排除法; EVsecond) を比較検討した。エクソソームの確認はウエスタンブロット法による CD63 蛋白質の発現および透過型電子顕微鏡による観察にて行った。エクソソーム分画から抽出した RNA を鋳型として ssDNA ライブラリを作成し、マイクロアレイ法 (Clariom D Array、Affymetrix) を用いてエクソソーム内に含まれる遺伝子・RNA 発現を網羅的に解析した。尚、マイクロアレイ解析に用いたチップは本研究の目的とする長鎖非コード RNA を約 3 万種カバーしており、十分な検討が可能である。

(2) インスリン抵抗性による細胞内 lncRNA の変化

C2C12 骨格筋細胞および 3T3-L1 脂肪細胞をモデルとして検討を行った。これらの細胞に高濃度のインスリン (C2C12 骨格筋細胞には 100 nM, 3T3-L1 脂肪細胞には 10 nM) を 48 時間作用させることで、インスリン作用低下モデルを作成した。インスリン作用の低下はインスリン長時間作用終了時に、同濃度のインスリンを含む新しい培地に入れ換えて、15 分間刺激を加えた細胞における Akt リン酸化で確認した (ウエスタンブロット法)。並行して培地のみの対照群を設定した。細胞より抽出した total RNA にて first strand cDNA を合成し、lncRNA の検出は RT² lncRNA PCR array (lncRNA PCR Array Mouse lncFinder, LAMM-001Z, Qiagen) を用い、定量的 real-time PCR 法 (StepOnePlus™, Applied Biosystems) にて行った。得られた増殖曲線から Ct 値を算出し、data は Web 解析 (GeneGlobe Data Analysis Center, Qiagen) にて行い、2 倍以上の発現変化を有意とした。

(3) 糖尿病治療薬メトホルミンによる lncRNA の変化

骨格筋培養細胞モデルとして C2C12 骨格筋細胞を用いた。この細胞にメトホルミンあるいは siRNA を作用させて検討を行った。培養培地中のグルコース濃度は Glucose (G0) Assay Kit (GAGO20-1KT, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を用いて測定した。lncRNA の発現変化はプールした cDNA サンプル (処置群および対照群) を用いて、RT² lncRNA PCR array にて検討した。Data は実験 (2) と同様に処理した。RNA 発現量は TaqMan® Gene expression assay (Applied Biosystems) を用いて測定した。GLUT1 や GLUT4 などのタンパク質発現量はウエスタンブロット法を用い、得られた band を定量解析した。糖取り込みの評価には [³H]-2-deoxyglucose を用い、液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. 研究成果

(1) インスリン抵抗性によるエクソソーム内 lncRNA の変化

細胞透過性セラミドを作用させた C2C12 骨格筋細胞において、Akt リン酸化を評価したところ、セラミドを作用させた C2C12 骨格筋細胞は対照群に比べインスリンによる Akt リン酸化は低下していた。このことからセラミドによるインスリン抵抗性の誘導が確認できた。

培養液中に分泌されたエクソソームの抽出に関して 3 種類の方法を検討した。エクソソームの存在はウエスタンブロット法による CD63 蛋白質の発現にて確認した。検討した 3 種類の抽出法のうちサイズ排除法が最もエクソソームの収量が多かった。エクソソームの存在はさらに透過型電子顕微鏡によっても確認した (図 1)。さらに、エクソソームを含有する分画より RNA を抽出し、その収量や質の検討を加えた。これらの検討をもとに、培養培地からのエクソソーム抽出方法を確立した。

図1 採取したエクソソーム
(未公表、今後公表予定)



セラミドによってインスリン抵抗性を誘導した細胞、および対照群の細胞培養培地を採取・濃縮し、サイズ排除法を用いてエクソソーム分画を採取した。エクソソームから抽出した RNA を鋳型としてプローブを作成し、マイクロアレイ法を用いてそこに含まれる遺伝子発現を網羅的に解析した。発現解析の結果、エクソソーム内に数多くの noncoding 遺伝子が検出できたとともに対照群と比較したセラミド群における lncRNA の変化リストが得られた。得られた個々の lncRNA が実際にセラミドの影響を受けるのかについて、いくつかの確認実験を行なった。また、アレイの結果から mRNA や miRNA の変化も同時に得られた。これらの結果より、病態を反映するエクソソーム中の核酸マーカー候補の基礎的なデータが得られた。

(2) インスリン抵抗性による細胞内 lncRNA の変化

C2C12 骨格筋細胞および 3T3-L1 脂肪細胞に対してインスリン抵抗性を引き起し、細胞内 lncRNA の変化を検討した。検討を行った 84 種類の lncRNA のうち、C2C12 骨格筋細胞においては上昇するものが 3 種類、低下するものが 1 種類であった。一方、3T3-L1 脂肪細胞においては上昇するものが 3 種類、低下するものが 18 種類であった。両細胞株に共通する lncRNA を 1 種類同定した。これらの結果より、インスリン長時間暴露によるインスリン抵抗性によって種々の細胞内 lncRNA が変化することが判明した。また、同様の処置を行っても変化する lncRNA は細胞種によって異なり、臓器特異性が示唆された。今後は本検討にて変化を認めた lncRNA が実際にどの程度変化するのか検証すること、さらには変化を確認できた lncRNA がインスリン作用とリンクするような生物学的性質を有しているのか検討を進め、最終的に臓器特異的なインスリン抵抗性 (作用低下) の惹起にかかわる lncRNA の解明につなげたい。

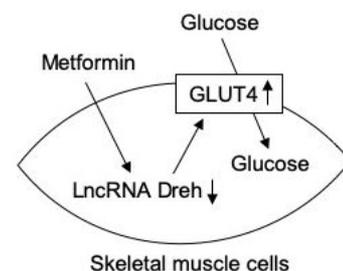
(3) 糖尿病治療薬メトホルミンによる lncRNA の変化

臨床で頻用されている糖尿病治療薬、メトホルミンの血糖降下作用は主に肝臓に作用することは知られているものの、腸管や骨格筋など多くの臓器への作用も報告されている。しかし、その作用機序は十分に明らかにされてはいない。そこで、生体内における最大の臓器である骨格筋におけるメトホルミンの作用を lncRNA の視点で検討を加えた。まず、細胞内の lncRNA に着目して検討を始めた。

メトホルミンが骨格筋細胞に作用していることを培地中のグルコース濃度の低下で確認し、次に lncRNA の発現変化に関する検討を行った。その結果、骨格筋細胞にメトホルミンを長時間作用させることによって 2 倍以上の発現変化を認めた lncRNA は計 20 種類あり、13 種類が増加し、7 種類が低下した。このうち最も変化 (低下) した lncRNA は AK050349 (lncRNA Dreh; Down-Regulated Expression by HBx) であった。実際にメトホルミンは C2C12 筋管細胞において lncRNA Dreh の発現を濃度および時間依存性に低下させた。そこで、lncRNA Dreh の発現低下の意義を探る目的で siRNA を用いてノックダウン実験を行ったところ、培養培地中のグルコース濃度が低下することを発見した。さらに細胞の糖取り込みを評価したところ、やはり lncRNA Dreh の発現低下は糖取り込みを促進させた。骨格筋細胞の糖取り込みは主に GLUT1 と GLUT4 が担っているため、それらのタンパク質発現量をウエスタンブロット法にて評価したが、細胞内発現量に変化を認めなかった。そこで細胞膜タンパク質を抽出し評価を加えたところ、Dreh のノックダウンによって GLUT4 タンパク質発現量は増加していた。これらの結果より、骨格筋細胞における lncRNA Dreh 発現低下は細胞膜上の GLUT4 発現量の増加を介して糖取り込みを促進させることが示された。骨格筋は生体内において糖取り込みにかかわる最大の臓器であることから、本研究成果をもとに、今後は Dreh をターゲットとした核酸医療などへの展望について期待される。

一方、これまでの報告からメトホルミンは骨格筋細胞において細胞膜の GLUT4 発現増加を介して糖の取り込みを促進することが知られている。そのような知見と本研究結果とを総合すると、メトホルミンの糖取り込み作用に lncRNA Dreh の低下が関わっている可能性が示唆された (図 2)。

図2 lncRNA Drehと糖取り込み



(4) まとめ

本研究期間を通じて、エクソソーム採取法の確立とインスリン抵抗性を反映するエクソソーム内在 lncRNA の解析を行うことができた。しかし、個々の発現量の解析と他のインスリン抵抗性モデルでの検証を通じて普遍性があるかの検討に時間を要するため、当初計画した研究期間内にすべての実験を完了することができなかった。このため、本研究項目については研究期間終了後も一定の成果が得られるまで継続して研究を進める計画である。一方、糖尿病治療薬で影響を受ける細胞内 lncRNA の検討を通じて、骨格筋の糖取り込みに関与する lncRNA を発見することができたことは本研究における重要な成果の一つとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Satoh Y, Takei N, Kawamura S, Takahashi N, Kotani T, Kimura AP. A novel testis-specific long noncoding RNA, Tesra, activates the Prss42/Tessp-2 gene during mouse spermatogenesis. *Biology of reproduction* 100:833-848, 2019. 査読有

DOI:10.1093/biolre/iory230

Kumano O, Ieko M, Komiyama Y, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Ohmura K, Hayasaki J, Hayakawa M. Basic evaluation of the newly developed "Lias Auto P-FDP" assay and the influence of plasmin- 2 plasmin inhibitor complex values on discrepancy in the comparison with "Lias Auto D-Dimer Neo" assay. *Clinical Laboratory* 64:433-442, 2018. 査読有

DOI:10.7754/Clin.Lab.2017.170902

Sarcoplipin expression is repressed by endoplasmic reticulum stress in C2C12 myotubes. Takahashi N, Kimura AP, Naito S, Yoshida M, Kumano O, Suzuki T, Itaya S, Moriya M, Tsuji M, Ieko M. *Journal of Physiology and Biochemistry* 73:531-538, 2017. 査読有

DOI:10.1007/s13105-017-0578-9

New formulas for mixing test to discriminate between lupus anticoagulant and acquired hemophilia A. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Suzuki T, Komiyama Y. *Thrombosis Research* 11:53-57, 2016. 査読有

DOI:10.1016/j.thromres.2016.05.004

Profiles of direct oral anticoagulants and clinical usage-dosage and dose regimen differences. Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. *Journal of Intensive Care* 4:19, 2016. 査読有

DOI:10.1186/s40560-016-0144-5

〔学会発表〕(計 5 件)

高橋伸彦、木村敦、大村一将、内藤澄悦、吉田美香、家子正裕 . C2C12 骨格筋細胞において lncRNA-AK050349 はメトフォルミンによって発現が低下し、その発現低下は糖取り込みを増加させる 第 62 回日本糖尿病学会年次学術集会 2019 年

佐藤優衣、武井夏海、川村翔平、高橋伸彦、小谷友也、山本雄広、渡辺健宏、松原伸、佐竹炎、木村敦 . マウス精巢特異的 lncRNA Tesra の発現パターンと転写活性化における機能 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

高橋伸彦、木村敦、大村一将、内藤澄悦、吉田美香、家子正裕 . Metformin によって発現が変化する骨格筋細胞内 long noncoding RNA に関する検討 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年

日野 里恵、高橋伸彦(11 人中 9 番目) . 身体活動量に着目した 2 型糖尿病患者における筋肉量減少因子の検討 第 51 回日本糖尿病学会北海道地方会 2017 年

高橋伸彦、木村敦、内藤澄悦、吉田美香、家子正裕 . インスリン長時間暴露による骨格筋および脂肪細胞内 long noncoding RNA の変化 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：家子 正裕

ローマ字氏名：(IEKO, Masahiro)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部 生体機能・病態学系 内科学分野

職名：教授

研究者番号(8桁)：50250436

研究分担者氏名：木村 敦

ローマ字氏名：(KIMURA, Atsushi)

所属研究機関名：北海道大学

部局名：理学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 90422005

(2)研究協力者

研究協力者氏名:熊谷 京子
ローマ字氏名:(KUMAGAI, Kyoko)

研究協力者氏名:寿楽 弘子
ローマ字氏名:(JURAKU, Hiroko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。